

Immunofenotyp limfocytów T u niemowląt i małych dzieci z hipogammaglobulinemią

Immunophenotype of T lymphocytes in infants and young children

ALEKSANDRA SZCZAWIŃSKA-POPŁONYK¹, HUSAM SAMARA², ANNA BRĘBOROWICZ¹, GRZEGORZ DWORACKI², LIDIA OSSOWSKA¹, AGATA KOLECKA-BEDNARCZYK²

¹ Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej, III Katedra Pediatrii

² Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wprowadzenie. Zaburzenia biosyntezy przeciwciał są najliczniej reprezentowaną kategorią pierwotnych niedoborów odporności o zróżnicowanej immunopatologii, manifestacji klinicznej i podłożu genetycznym. W wielu schorzeniach z tej grupy defekty różnicowania i dojrzewania limfocytów B zostały dobrze określone, natomiast rola limfocytów T w patomechanizmie hipogammaglobulinemii u niemowląt i małych dzieci nie została wyjaśniona.

Cel badania. Wyjaśnienie, czy niedobory przeciwciał u niemowląt i małych dzieci związane są z zaburzeniami w zakresie ekspresji wybranych markerów subpopulacji limfocytów T, co pozwoliłoby na lepsze zrozumienie patomechanizmu hipogammaglobulinemii.

Materiał i metody. Badaniem objęto 22 dzieci w wieku od 8 do 61 miesięcy, u których stwierdzono niedobór jednego lub więcej izotypów immunoglobulin. Ocenę dojrzewania populacji limfocytów T krwi obwodowej przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej. Identyfikowane markery powierzchniowe obejmowały CD45, CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD45RA i CD45RO.

Wyniki. Charakterystyczny immunofenotyp obejmował zwiększony odsetek populacji komórkowej CD3+CD4-CD8- o cechach czynnościowej niedojrzałości oraz zwiększoną ekspresję markerów aktywacji limfocytów T – HLA-DR i CD45RO.

Wnioski. Zaburzenia biosyntezy przeciwciał u niemowląt i małych dzieci nie są ograniczone wyłącznie do hipogammaglobulinemii, ale także obejmują spektrum zaburzeń komórkowych elementów układu odpornościowego.

Słowa kluczowe: hipogammaglobulinemia, limfocyty T, immunofenotyp, dzieci

Summary

Introduction. Antibody biosynthesis defects are the most prevalent category of primary immune deficiencies of diverse immunopathology, clinical manifestation and genetic background. In numerous disorders of antibody production, defects of B lymph cells differentiation and maturation have been well recognized. However, the role of T lymph cells in the pathomechanism of hypogammaglobulinemia in infants and young children has not been elucidated.

Aim of the study. The purpose of the study was examination whether deficiencies of antibody production in infants and young children are associated with disturbances of expression of the selected surface markers on T lymph cell subsets. These informations could contribute to better understanding of the pathomechanism of hypogammaglobulinemia.

Materials and methods. Twenty-two children, aged from 8 to 61 months in whom deficiency of one or more immunoglobulin isotype was revealed, were included in the study. Immunophenotypic evaluation of peripheral blood T lymph cells maturation was conducted by flow cytometry. The identified surface markers were CD45, CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD45RA and CD45RO.

Results. Characteristic immunophenotype included the increased proportion of functionally immature CD3+CD4-CD8- lymph cell population as well as increased expression of T lymph cell activation markers – HLA-DR and CD45RO.

Conclusions. Antibody biosynthesis defects in infants and young children are not exclusively confined to hypogammaglobulinemia, but they also comprise a spectrum of disorders of cellular elements of the immune system.

Keywords: hypogammaglobulinemia, T lymphocytes, immunophenotype, children

© *Alergia Astma Immunologia* 2013, 18 (3): 175-181

www.alergia-astma-immunologia.eu

Przyjęto do druku: 19.07.2013

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Aleksandra Szczawińska-Popłonyk

Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań

tel./fax: 61-848 01 11

e-mail: ola@malwa.com.pl,

e-mail instytucji: klinikapad@skp.ump.edu.pl

WPROWADZENIE

Hipogammaglobulinemia u małych dzieci stanowi grupę zaburzeń wytwarzania przeciwciał o złożonej patogenezie, zróżnicowanej manifestacji klinicznej i odmiennym rokowaniu. Może być ona sygnałem genetycznie uwarunkowanego pierwotnego niedoboru odporności związanego z głębokim defektem odpowiedzi immunologicznej na antygeny, ale może także odzwierciedlać przejściowe opóźnienie dojrzewania izotypów immunoglobulin. Zaburzenia w zakresie subpopulacji limfocytów B w szeregu jednostek chorobowych związanych z upośledzeniem biosyntezy przeciwciał zostały stosunkowo dobrze zbadane [1-3] i były one również tematem naszych wcześniejszych doniesień [4,5], natomiast rola limfocytów T w patogenezie tych schorzeń nie została szczegółowo wyjaśniona, a stąd korelacje diagnostyczno-kliniczne nie zostały dobrze określone.

Homeostaza obwodowej puli limfocytów T zapewniona jest dzięki wymianie i recyrkulacji pomiędzy limfocytami T na obwodzie i komórkami opuszczającymi grasnicę (*recent thymic emigrants*, RTE), które tworzą pulę najbardziej niedojrzałych, różniących się od dojrzałych, choć naiwnych limfocytów T. Dojrzałe limfocyty T definiowane są poprzez ekspresję markerów CD3 i CD4 na limfocytach pomocniczych lub CD3 i CD8 na limfocytach supresyjno-cytotoksycznych, zaś zróżnicowanie pomiędzy limfocytami T naiwnymi a komórkami pamięci umożliwia badanie obecności izoform przezbłonowej fosfatazy tyrozynowej CD45RA i CD45RO, odpowiednio. Część CD45 nie tylko odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu sygnału aktywującego limfocyty T poprzez kompleks CD3-TCR, CD4/CD8 oraz CD2 [6], ale komórki T CD4+CD45RO spełniają także funkcję pomocniczą wobec limfocytów B i indukują sekrecję IgG [7]. Zaburzenia w zakresie fenotypowej konwersji limfocytów T naiwnych do komórek T pamięci oraz związane z odchyleniami ekspresji markera CD45 nieprawidłowości w odpowiedzi immunologicznej na stymulację antygenową stwarzać mogą podłoże dla upośledzenia wytwarzania przeciwciał.

Specyficzna ekspresja powierzchniowych molekuł zaangażowanych w rozpoznawanie antygenów i aktywację limfocytów T odzwierciedla zależne od czasu inicjowanie i regulowanie odpowiedzi immunologicznej. Występowanie klasycznych antygenów głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*, MHC) klasy II ograniczone jest przede wszystkim do limfocytów B oraz komórek prezentujących antygen (*antigen presenting cells*, APC), takich jak makrofagi, monocyty i komórki dendrytyczne, ale charakterystycznym zjawiskiem jest ekspresja antygeny HLA-DR także na aktywowanych limfocytach T. Ocena aktywacji limfocytów T oparta na analizie występowania markera HLA-DR może być pośrednio także odzwierciedleniem stymulacji limfocytów B i syntezy przeciwciał [8].

W celu zbadania, czy niedobory wytwarzania przeciwciał u niemowląt i małych dzieci charakteryzują zaburzenia w zakresie populacji limfocytów T, podjęte zostały badania ekspresji wybranych markerów powierzchniowych. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patomechanizmu hipogammaglobulinemii u niemowląt i małych dzieci.

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

Badaniem przeprowadzonym w pediatrycznej klinice pneumologii, alergologii i immunologii oraz przedstawionym w niniejszym opracowaniu objęto grupę 22 dzieci z hipogammaglobulinemią, 17 chłopców i 5 dziewczynek, w wieku od 8 miesięcy do 5 lat (61 miesięcy); średnia wieku dzieci w grupie badanej wynosiła 26 miesięcy (mediana 23 miesiące). Projekt badawczy został zaakceptowany przez Uniwersytecką Komisję Bioetyczną. Zgodnie z Deklaracją Helsińską przed przystąpieniem do badania uzyskano od rodziców pisemną, świadomą zgodę na uczestnictwo. Immunizację czynną przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, tężcowi, błonicy oraz zakażeniu *Haemophilus influenzae* typu b przeprowadzono u wszystkich dzieci zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień, co umożliwiło ocenę odporności poszczepiennej przeciwko wymienionym schorzeniom infekcyjnym. U wszystkich dzieci po urodzeniu przeprowadzono szczepienie przeciwko gruźlicy. Indywidualne różnice dotyczyły innych szczepień, zarówno obowiązkowych, jak i zalecanych. Szczepienie przeciwko odrze, śwince i różyczce nie zostało przeprowadzone u 6 dzieci; u trójga nich ze względu na wiek poniżej 13 miesiąca życia, u dwojga dzieci z uwagi na nawracające infekcje dróg oddechowych, a u kolejnego dziecka przeciwwskazanie do szczepienia stanowiły objawy neurologiczne. Z tej samej przyczyny pacjent ten otrzymał szczepionkę acelularną przeciwko krztuścowi. Spośród 22 dzieci z grupy badanej, pięcioro otrzymało skoniugowaną szczepionkę przeciwko pneumokokom, a dwoje – przeciwko meningokokom. Niepożądany odczyn poszczepienny w postaci ropnia i nacieku zapalnego skóry i tkanki podskórnej uda stwierdzono u jednego pacjenta w 7 miesiącu życia, po podaniu szczepionki pięciowalentnej, zawierającej toksoidy tężcowy i błonicy, szczepionkę przeciwko krztuścowi z komponentą acelularną, inaktywowaną przeciwko polio-myelitis i skoniugowaną przeciwko *Haemophilus influenzae* typu b (Pentaxim).

Zasadniczym problemem zdrowotnym u wszystkich dzieci były nawracające zakażenia dolnych dróg oddechowych – zapalenia oskrzeli i zapalenia płuc, których występowanie stanowiło wskazanie do diagnostyki w kierunku pierwotnego niedoboru odporności. Ponadto, dwoje dzieci przebyło ciężkie, zagrażające życiu zakażenia o lokalizacji pozapłucnej – jedno dziecko ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych z towarzyszącą sepsą, zaś u drugiego pacjenta punktem wyjścia do rozwoju sepsy było zakażenie układu moczowego.

Choroby alergiczne były podawane w wywiadzie u 12 dzieci; najczęściej stwierdzana była alergia pokarmowa (u wszystkich 12 dzieci, tj. u 100% badanych dzieci, u których podawano choroby alergiczne w wywiadzie), rozpoznanie astmy ustalone zostało u 9 dzieci, natomiast zarówno atopowe zapalenie skóry, jak i alergiczny nieżyt błony śluzowej nosa występowały u 2 dzieci.

Jedno dziecko leczone było z powodu schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym – cukrzyca insulinozależnej.

Objawy neurologiczne stwierdzano u dwojga dzieci – jedno z dzieci chorowało na padaczkę, u drugiego natomiast rozpoznano mózgowo-porażenie dziecięce.

Wywiad rodzinny w kierunku pierwotnych niedoborów odporności był obciążony u dwojga dzieci i w obu przypadkach były to defekty wytwarzania przeciwciał -prześciowa hipogammaglobulinemia niemowląt u siostry badanej dziewczynki i pospolity zmienny niedobór odporności u kuzyna badanego chłopca. Obciążenie rodzinne alergią stwierdzono na podstawie wywiadu u 9 dzieci, natomiast w rodzinie jednego dziecka ujawniono wystąpienie choroby autoimmunizacyjnej (choroba Leśniowskiego-Crohna).

Kryteria włączenia do badania

Najważniejszym kryterium włączenia do badania, determinującym równocześnie wskazania do dalszej poszerzonej diagnostyki immunologicznej było obniżone w stosunku do normy wiekowej stężenie immunoglobuliny G w surowicy lub IgG oraz jednego albo dwóch izotypów. Zgodnie z tym kryterium grupa badana, licząca 22 dzieci, podzielona została na następujące 4 podgrupy obejmujące: A – z selektywnym niedoborem IgG (n=6), B – z niedoborem IgG i IgM (n=3), C – z niedoborem IgG i IgA (n=7), D – z niedoborem wszystkich trzech izotypów IgG, IgM oraz IgA (n=6).

Przygotowanie komórek i immunofenotypowanie leukocytów krwi obwodowej

Krew żylna od pacjentów pobierana była w objętości 2 ml do probówek z antykoagulantem (kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA-K2), transportowana i przechowywana w temperaturze 4-8°C i była badana w ciągu 24 godzin od momentu pobrania.

Do znakowania komórek stosowano mysie przeciwciała monoklonalne związane z fluorochromami: CD45-FITC, CD14-PE, CD3-FITC, PerCP, CD4-FITC, APC, CD8-PE, CD45RA-FITC, CD45RO-PE, HLA-DR-FITC (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Badane próbki krwi zmieszano z odpowiednimi przeciwciałami w proporcjach zalecanych przez producenta i inkubowano w ciemnej komorze przez 15 minut w temperaturze pokojowej. W celu hemolizy erytrocytów i utrwalenia barwienia immunofluorescencyjnego pozostałych komórek przed przystąpieniem do analizy metodą cytometrii przepływowej próbki inkubowano z 2 ml roztworu powodującego lizę komórek (FACS Lysing Solution, Beckton-Dickinson, USA) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki dwukrotnie odwirowano i zawieszono w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS)(Roche, Mannheim, Niemcy). Próbki poddawano akwizycji przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto i oprogramowania FACSDiva (Beckton-Dickinson, USA).

Populacje limfocytów i subpopulacje limfocytów T wyodrębniono na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych, a ich wartości względne (procentowe) otrzymano metodą sekwencyjnego bramkowania komórek na rozrzutach dwuparametrycznych. Uzyskano wartości procentowe limfocytów CD45hiCD14- wśród leukocytów, podstawowych subpopulacji limfocytów T CD3+, wśród nich CD4+ i CD8+ oraz komórek aktywowanych CD3+HLA-DR+. Wśród limfocytów T wyodrębniono komórki pomocnicze naiwne CD3+C-D4+CD45RA+ i komórki pomocnicze pamięci CD3+C-D45RO+. Przy każdej próbce wykonano kontrolę ujemną

z użyciem mysich łańcuchów gamma $\gamma 1$ i $\gamma 2a$, znakowanych odpowiednio FITC i PE. Liczbę bezwzględną komórek każdej z wyżej wymienionych subpopulacji obliczono mnożąc jej wartość odsetkową przez liczbę bezwzględną limfocytów z rozmazu krwi obwodowej otrzymaną z analizatora SY-SMEX.

Wartości limfocytów T krwi obwodowej podane w publikacji Schatorje i wsp. [9] przyjęto za referencyjne w ocenie analizowanych subpopulacji limfocytów T; w ocenie markerów różnicowania CD45RA i CD45RO, a także markerów aktywacji HLA-DR przyjęto normy podane w publikacji Huenecke i wsp. [10].

Analiza statystyczna

W celu zapewnienia porównywalności wartości analizowanych cech w obrębie badanej grupy dzieci, w stosunku do której odnoszą się różne przedziały normy wynikające z wieku, dla potrzeb analizy statystycznej przeprowadzona została normalizacja tych wartości. Indywidualny poziom każdego badanego czynnika odniesiony został do odpowiedniego dla danego dziecka przedziału normy według następującego wzoru:

$$Norm[X] = 1 - \frac{NorD - X}{NorG - NorD}$$

w którym:

X – oznaczony u dziecka poziom czynnika,

Norm[X] – znormalizowany poziom czynnika,

NorD – dolna granica przedziału normy wiekowej,

NorG – górna granica przedziału normy wiekowej

Uzyskane w ten sposób wartości znormalizowane są liczbami niemianowanymi i charakteryzują się następującymi właściwościami: liczby mniejsze od 1 odpowiadają oznaczeniom „poniżej normy”, liczby od 1 do 2 odpowiadają oznaczeniom „w granicach normy”, przy czym wielkość dystansu od 1 lub 2 to stopień oddalenia od (odpowiednio) dolnej lub górnej granicy przedziału normy, liczby powyżej 2 odpowiadają oznaczeniom „powyżej normy”. W dalszym ciągu nazwy analizowanych cech poprzedzone przedrostkiem „Norm_” oznaczać będą cechy znormalizowane w opisany sposób.

Celem oceny zależności pomiędzy badanymi czynnikami zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ), który wykorzystywany jest do opisu korelacji dwóch cech ilościowych w przypadku niewielkiej liczby obserwacji. Współczynnik ρ przyjmuje wartości z zakresu od -1 do 1, przy czym jego zbliżone do 0 świadczą o braku korelacji pomiędzy badanymi zmiennymi, a wartości bliskie końcom tego przedziału świadczą o silnej zależności. Poziom istotności p współczynnika korelacji rangowej poniżej 0,05 oznaczał zależność istotną statystycznie.

W celu wyjaśnienia, jaka część zmienności analizowanej cechy jest wyjaśniana przez drugą z cech wyznaczono współczynnik determinacji R^2 , który przyjmuje wartości z przedziału od 0 do 1. Graficznie przedstawiono model liniowy trendu wybranych zależności analizowanych danych.

Ponadto w opracowaniu użyte zostały metody statystyczne: test Kruskala-Wallisa, test Manna-Whitney'a, dokładny test Fishera. Wszystkie analizy przeprowadzone zostały przy pomocy programu STATISTICA firmy StatSoft.

WYNIKI

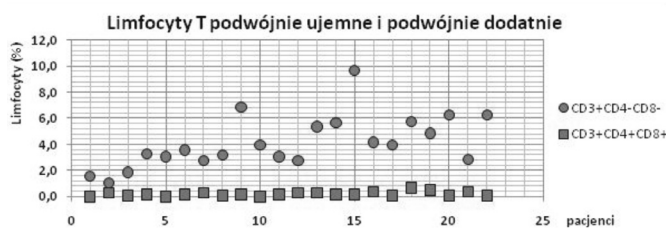
Tymocyty

Najbardziej niedojrzałe postaci limfocytów T, które zidentyfikowano w analizie immunofenotypowej krwi obwodowej u dzieci z badanej grupy, stanowiły limfocyty T podwójnie ujemne (DN) o fenotypie CD3+CD4-CD8- oraz limfocyty podwójnie dodatnie (DP) o fenotypie CD3+CD4+CD8+. Najmniejsza wartość procentowa limfocytów DN wynosiła 1,1% i została stwierdzona u 9-miesięcznego niemowlęcia, zaś największa wartość procentowa, 9,7%, została odnotowana u dziecka w wieku 27 miesięcy (ryc. 1). Populacja komórek DP była nielicznie reprezentowana wśród limfocytów T krwi obwodowej – jej wartość procentowa wahała się u badanych dzieci w granicach od 0,0 do 0,7% (ryc. 1).

Limfocyty T CD4+ i CD8+

W zakresie populacji limfocytów T CD3+ stwierdzono zmniejszenie wartości procentowej tych komórek u dwojga dzieci, a liczby bezwzględnej – u jednego dziecka, w wieku 9 miesięcy. U tych samych pacjentów zmniejszona była także wartość względna limfocytów T subpopulacji CD4+, u 9-miesięcznego niemowlęcia – również liczba bezwzględna tych komórek. Wartość procentowa limfocytów T CD8+ była zmniejszona u dwojga dzieci, natomiast liczba bezwzględna komórek tej subpopulacji była zmniejszona aż u 10 dzieci z grupy badanej, z czego sześć dzieci było w wieku powyżej 24 miesiąca życia. U dwojga dzieci z badanej grupy zwiększona była liczba bezwzględna limfocytów T CD3+, która współistniała ze zwiększoną liczbą bezwzględną subpopulacji CD3+CD8+. U jednego z tych dzieci stosunek CD4:CD8 był zmniejszony, u drugiego – zwiększony. Łącznie zwiększenie stosunku CD4:CD8 obserwowano u czworga dzieci.

Ekspresja izoform CD45RA/CD45RO na limfocytach T CD4+. Zgodnie z danymi przedstawionymi w publikacji Huenecke i wsp. [10], limfocyty T o fenotypie CD4+CD45RO stanowią we krwi obwodowej od 12% do 50% wszystkich limfocytów T pomocniczych i liczba ich istotnie zwiększa się od okresu wczesnego dzieciństwa do wieku dorosłego. W grupie badanej ekspresja izoformy 45RO, charakterystycznej dla limfocytów T pamięci wahała się w granicach od 10,1% do 78,2% populacji limfocytów CD4+. Najwyższe



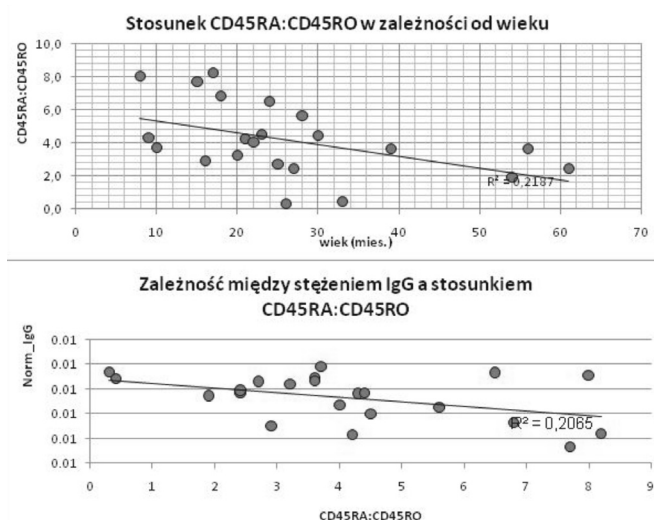
Ryc. 1. Wartość procentowa limfocytów T podwójnie ujemnych CD3+CD4-CD8- i wartość procentowa limfocytów T podwójnie dodatnich CD3+CD4+CD8+ we krwi obwodowej u badanych dzieci

wartości procentowe zanotowano u dwójki dzieci, wynosiły one 72,2% i 78,2% komórek CD4+CD45RO. Najniższą wartość procentową tych komórek stwierdzono u najmłodszego dziecka z badanej grupy, w wieku 8 miesięcy. Również ekspresja izoformy CD45RA, cechującej limfocyty T naiwne była wysoka u najmłodszych niemowląt, w wieku 8 miesięcy i 9 miesięcy, u których przekraczała 80% puli limfocytów CD4+. Łącznie u 9 dzieci spośród wszystkich badanych pacjentów wartość względna limfocytów T CD4+CD45RA była większa niż 80%. Stosunek CD45RA:CD45RO, przekraczający wartość 8,0 stwierdzono u dwójki dzieci, w tym u 8-miesięcznego niemowlęcia. W oparciu o analizę statystyczną wykazano, że stosunek ten ulegał obniżeniu wraz z wiekiem dzieci w badanej grupie, co ilustruje wykres linii trendu tej zależności (ryc. 2). Współczynnik determinacji R² wynosił w tym przypadku 0,2187, co oznacza, że około 22% zmienności jednej z powyższych cech było wyjaśniane przez drugą z tych cech.

Ekspresja późnego markera aktywacji HLA-DR na limfocytach T

W opinii cytowanych wcześniej autorów [9], komórki o fenotypie CD3+HLA-DR+ stanowią we krwi obwodowej od 1,6% do 5,5% puli limfocytów T i wykazują z wiekiem tendencję wzrostową w zakresie wartości procentowej. W badanej grupie dzieci wartość procentowa tych komórek wynosiła od 1,4% do 17,6%. Największe wartości procentowe, 16,9% i 17,6% stwierdzono u dwójki dzieci, u których wykazano także dużą wartość procentową, 78,2% i 72,2%, odpowiednio, komórek wykazujących ekspresję izoformy CD45RO na limfocytach T CD4+ oraz mały stosunek CD45RA:CD45RO, wynoszący 0,4 i 0,3, odpowiednio.

Badano także zależności pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG u dzieci i wartościami procentowymi i liczbami bezwzględnymi subpopulacji limfocytów T. Korelacja pomiędzy znormalizowanym poziomem IgG i stosunkiem CD45RA:



Ryc. 2. Linia trendu korelacji pomiędzy stosunkiem limfocytów T pomocniczych naiwnych do limfocytów T pamięci CD4+CD45RA:CD4+CD45RO a wiekiem badanych dzieci oraz linia trendu pomiędzy znormalizowanym stężeniem IgG w surowicy a stosunkiem CD4+CD45RA:CD4+CD45RO

CD45RO była umiarkowanie silna, ale nie była ona istotna statystycznie. Linia trendu dla tej korelacji przedstawiona została na rycinie 2. Współczynnik determinacji R^2 wyniósł w tym przypadku 0,2065, co wskazuje, że około 20% zmienności jednej z cech wyjaśniane było przez drugą z cech.

Przeanalizowano także zależności pomiędzy rodzajem hipogammaglobulinemii a wartościami procentowymi i liczbami bezwzględными subpopulacji limfocytów T. Istotną statystycznie korelację ($p=0,026$) wykazano pomiędzy podgrupami hipogammaglobulinemii i znormalizowaną wartością procentową limfocytów T CD8+. Rycina 3 ilustruje wynik porównań wielokrotnych, który wskazuje, że zasadniczą przyczynę tej istotności statystycznej stanowiła istotność statystyczna różnicy pomiędzy podgrupami B i C.

DYSKUSJA

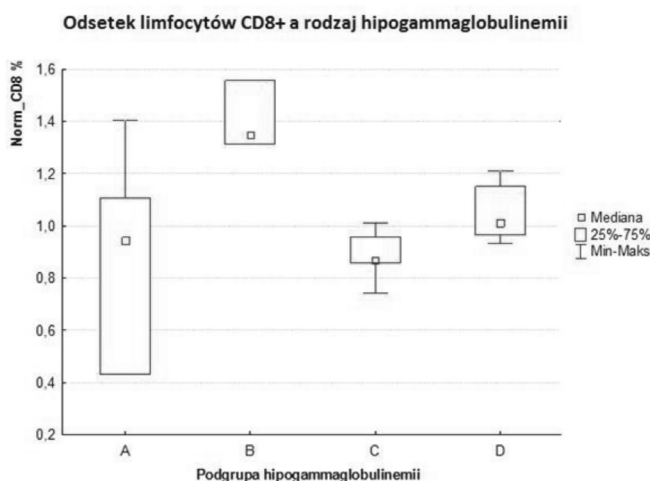
Zaburzenia biosyntezy przeciwciał w okresie wczesnego dzieciństwa są heterogenne pod względem obrazu klinicznego i rokowania, a leżące u ich podłoża patomechanizmy mają złożony charakter, czego odzwierciedleniem są zróżnicowane wyniki badań nad immunofenotypem limfocytów. W przejściowej hipogammaglobulinemii niemowląt (*transient hypogammaglobulinemia of infancy*, THI) wskazują one zarówno na zwiększoną odpowiedź związaną z limfocytami pomocniczymi (T helper) Th1 i wytwarzaniem interleukiny (IL) 12 [11], jak i na zwiększoną liczbę limfocytów T supresyjno-cytotoksycznych subpopulacji CD8+ [12] oraz na zwiększoną liczbę limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+Foxp3+ [13]. Z kolei w badaniu Batemana i wsp. obejmującym pacjentów z pospolitym zmiennym niedoborem odporności (*common variable immunodeficiency*, CVID) i innymi pierwotnymi zaburzeniami wytwarzania przeciwciał wykazano zarówno zmniejszenie liczby limfocytów T migrujących z grasicy, naiwnych limfocytów T CD4+ i równocześnie zwiększenie liczby komórek T terminalnie zróżnicowanych, sugerując stan aktywacji limfocytów T [14]. W analizie immunofenotypowej należy wziąć pod uwagę istotny fakt, że dynamiczny rozwój i dojrzewanie układu odpornościowego w dzieciństwie implikuje różnice dotyczące zarówno bezwzględnej wielkości

puli limfocytów, jak i w zakresie względnych wartości poszczególnych subpopulacji i ich stosunku względem siebie. Prześledzenie dynamiki zmian składu i wzajemnych proporcji składowych puli limfocytów krwi obwodowej u dzieci nie tylko wymaga zastosowania kryterium wiekowego, ale w interpretacji wyników badań cytometrycznych powinny być uwzględnione także inne istotne czynniki, jak infekcje czy stosowane leczenie immunosupresyjne.

Bezwzględna liczba limfocytów zwiększa się natychmiast po urodzeniu, pozostaje następnie względnie stała do wieku 2 lat, odkąd stopniowo zmniejsza się trzykrotnie do wieku dorosłego. Limfocyty T CD3+ wykazują zwiększenie ich liczby po urodzeniu, a u dzieci od 2 lat do wieku dorosłego ich liczba trzykrotnie zmniejsza się. Podobny wzorec dynamiki cechuje komórki subpopulacji CD3+CD4+, z kolei liczba limfocytów T CD3+CD8+ pozostaje stabilna do wieku 2 lat i stopniowo trzykrotnie zmniejsza się do wieku dorosłego. Zwiększona po urodzeniu liczba aktywowanych limfocytów T CD3+HLA-DR+ pozostaje stała aż do 10 roku życia, a następnie zmniejsza się [15]. Znaczenie biologiczne zjawiska dynamicznych zmian w zakresie zarówno liczby bezwzględnej, jak i względnych wartości puli limfocytów jako całości, jak i poszczególnych ich subpopulacji odzwierciedla nabywanie kompetencji immunologicznej, wynikającej z kontaktu antygenowego.

Stadia dojrzewania pochodzących ze szpiku kostnego prekursorów w kierunku czynnościowo sprawnych limfocytów T, odgrywające zasadnicze znaczenie dla rozwoju adaptywnej odpowiedzi immunologicznej, zachodzą w grasicy. Ten wieloetapowy proces, obejmujący powstanie szeregu puli komórek migrujących w mikrośrodowisku grasicy, nie znajduje bezpośrednio swojego odzwierciedlenia we krwi obwodowej, do której przechodzą dojrzałe limfocyty T. W puli limfocytów T CD4+ i CD8+, opierając się na analizie ekspresji izoform markera CD45, wyróżnić można limfocyty T naiwne i limfocyty T pamięci. U noworodków dominują limfocyty T naiwne; ich wartość procentowa we krwi pępowinowej wynosi średnio 85. Do 6 roku życia zwiększa się zarówno wartość procentowa, jak i liczba bezwzględna komórek T pamięci, wykazujących ekspresję antygeny CD45RO, zarówno w obrębie subpopulacji CD4+, jak i CD8+, a następnie wzajemny stosunek limfocytów T naiwnych do limfocytów T pamięci pozostaje stosunkowo stabilny [16]. Informacje te, charakteryzujące indywidualny immunofenotyp w okresie wczesnodziecięcym, są niezbędne dla właściwego zrozumienia i prawidłowej interpretacji zjawisk zachodzących w zakresie subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej, identyfikowanych w oparciu o cytometrię przepływową.

Podjęte badania celem scharakteryzowania subpopulacji limfocytów T wykazały występowanie zwiększonego odsetka limfocytów T podwójnie ujemnych wprawdzie w pojedynczych przypadkach pacjentów z hipogammaglobulinemią, jednak z uwagi na przypisywaną komórkom o fenotypie CD3+CD4-CD8- funkcję immunoregulacyjną, zjawisko to może być jednym z elementów składających się na patomechanizm zmniejszonej biosyntezy przeciwciał. Wspomniana populacja komórek T, podobnie jak limfocyty T CD4+CD25+Foxp3+, limfocyty T gamma/delta czy CD8+CD28- czy komórki NK, wchodzi w interakcje z efektorowymi limfocytami



Ryc. 3. Wykres zróżnicowania wartości procentowych limfocytów T CD8+ pomiędzy podgrupami pacjentów zależnie od rodzaju hipogammaglobulinemii

mi T i moduluje ich działanie [17,18]. Podobnie, hamowaniu podlegać może także odpowiedź limfocytów B na alloantygenu i ich funkcja syntezy immunoglobulin [19].

Analiza immunofenotypowa wykazała ponadto zmniejszenie wartości procentowych zarówno limfocytów CD3+, jak i subpopulacji CD4+ oraz CD8+ u pojedynczych pacjentów. Z kolei zmniejszenie liczby bezwzględnej limfocytów T CD8+ stwierdzono u 10, tj. 45% dzieci z badanej grupy, a wśród nich najczęściej były to dzieci z zaburzeniem wytwarzania IgG i IgA. Sześciorgo dzieci prezentujących zmniejszoną liczbę limfocytów T CD8+ stanowili pacjenci powyżej 24 miesiąca życia. Sugerować to może wpływ deficytu odporności komórkowej zależnej od limfocytów T CD8+ na opóźnienie wytwarzania izotypów immunoglobulin, być może na drodze upośledzenia funkcji cytotoksycznej i związanej z tym predyspozycji do zakażeń [20].

W niniejszej pracy uwzględniono także markery różnicowania limfocytów T naiwnych i limfocytów T pamięci, tj. izoformy CD45RA i CD45RO, które nie były dotychczas przedmiotem badań u dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał. Ekspresja różnych izoform CD45 zależna jest od poszczególnych subpopulacji komórkowych, stadium ich różnicowania, uprzedniej ekspozycji na antygeny i stanu aktywacji. Obserwowana w badanej grupie dzieci u dziewięciorga spośród nich, a dotychczas nie stwierdzana w literaturze dotyczącej zagadnienia hipogammaglobulinemii, ekspresja izoformy CD45RA na ponad 80% limfocytów T CD4+ może być zjawiskiem czynnościowym odgrywającym rolę w patogenezie upośledzonej syntezy przeciwciał. Dominacja izoformy CD45RA w populacji limfocytów T pomocniczych fizjologicznie jest zależna od wieku i kontaktu dojrzewającego układu odpornościowego małego dziecka z antygenami, co wykazano również w analizie ekspresji CD45RA w badanej grupie dzieci zależnie od ich wieku. W szczególności fakt, że największą wartość procentową w populacji limfocytów T CD4+ stanowiły komórki CD45RA u niemowląt, a równocześnie najmniejszą ekspresję izoformy CD45RO, charakterystycznej dla limfocytów T pamięci stwierdzono u najmłodszego niemowlęcia spośród wszystkich badanych dzieci, odzwierciedlać może właśnie zależność wiekową ekspresji tego antygeny. Równocześnie, zmniejszenie przewodzenia sygnału przez receptor TCR i in-

dukowania sekrecji immunoglobulin przez limfocyty B może nie być tylko wykładnikiem fizjologicznej niewielkiej ekspozycji na antygeny we wczesnym dzieciństwie, ale objawem zaburzenia dojrzewania adaptatywnej odpowiedzi immunologicznej, które jest jednak w oparciu o uzyskane wyniki trudne do przewidzenia.

Podobnie, u niemowląt poniżej średniej wartości procentowej wyliczonej dla dzieci z grupy badanej, kształtowała się ekspresja późnego markera aktywacji HLA-DR na komórkach CD3+. Jakkolwiek opierając się na publikacji Huenecke i wsp. [10], którzy obserwowali stopniowe zwiększenie wartości procentowej komórek CD3+HLA-DR+ wraz z wiekiem dzieci, można uznać to zjawisko za odzwierciedlenie procesu dojrzewania układu odpornościowego.

Interesujące jest, że u dwojga dzieci, u których stwierdzono największą wartość względną limfocytów CD3+, charakteryzujących się ekspresją molekuly HLA-DR, wykazano również największą procentową wartość komórek CD4+CD45RO. Współistnienie dużej ekspresji dwóch różnych markerów aktywacji u tych dzieci odzwierciedla zwiększoną aktywność adaptatywnej odpowiedzi immunologicznej, a nie związek z ich wiekiem. Interpretacja stopnia ekspresji markerów aktywacji na limfocytach T, poddana wpływowi szeregu czynników w okresie wczesnodziecięcym, jest trudna w aspekcie możliwego związku przyczynowo-skutkowego z zaburzeniami syntezy przeciwciał.

WNIOSKI

W badanej grupie dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał nie stwierdza się nieprawidłowości w zakresie tymopoezy, natomiast dominują zaburzenia dojrzewania subpopulacji T krwi obwodowej, zarówno na wczesnych, jak i na terminalnych etapach tego procesu. Ekspansja czynnościowo niedojrzałych populacji komórkowych, wraz z cechami aktywacji limfocytów T stanowią zasadnicze elementy immunopatologiczne hipogammaglobulinemii u dzieci. Zaburzenia biosyntezy przeciwciał mają charakter wieloczynnikowy i nie są wyłącznie ograniczone do hipogammaglobulinemii, ale obejmują spektrum zaburzeń komórkowych.

Piśmiennictwo

1. Piątosza M, Pac M, Siewiera K i wsp. Common variable immune deficiency in children – clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. *J Clin Immunol* 2013; 33: 731-41.
2. van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJ, van Dongen JJ. Dissection of B cell development to unravel defects in patients with a primary antibody deficiency. *Adv Exp Med Biol* 2011; 697: 183-96.
3. Cipe FE, Dogu F, Guloglu D i wsp. B-cell subsets in patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy, partial IgA deficiency, and selective IgM deficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2013; 23: 94-100.
4. Szczawińska-Popłonyk A, Zelent A, Dachtera A, Bręborowicz A. Hipogammaglobulinemia u niemowląt i małych dzieci – charakterystyka kliniczna i immunodiagnostyczna. *Alergia Astma Immunologia* 2009; 14: 121-32.
5. Szczawińska-Popłonyk A, Samara H, Bręborowicz A i wsp. Znaczenie badania markerów powierzchniowych limfocytów B u dzieci z defektami biosyntezy przeciwciał. *Alergia Astma Immunologia* 2012; 17: 97-102.
6. Hermiston ML, Zheng X, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells. *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 107-37.
7. Early E, Reen DJ. Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 527-33.
8. Tabata H, Matsuoka T, Endo F i wsp. Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 34998-5005.

9. Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ i wsp. Pediatric reference values for the peripheral T-cell compartment. *Scand J Immunol* 2012; 75: 436-44.
10. Huenecke S, Behl M, Fadler C i wsp. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis. *Eur J Hematol* 2008; 80: 532-9.
11. Kowalczyk D, Baran A, Webster ADB, Zembala M. Intracellular cytokine production by Th1/Th2 lymphocytes and monocytes of children with symptomatic transient hypogammaglobulinemia of infancy (THI) and selective IgA deficiency (SIgAD). *Clin Exp Immunol* 2001; 127: 507-12.
12. Karaca NE, Aksu G, Gulez N i wsp. New laboratory findings in Turkish patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2010; 9: 237-43.
13. Rutkowska M, Lenart M, Bukowska-Strakovà K i wsp. The number of circulating CD4+ CD25high Foxp3+ T lymphocytes is transiently elevated in the early childhood of transient hypogammaglobulinemia of infancy patients. *Clin Immunol* 2011; 140: 307-10.
14. Bateman EAL, Ayers L, Sadler R i wsp. T cell phenotypes in patients with common immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol* 2012; 170: 202-11.
15. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R i wsp. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997; 130: 388-93.
16. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE i wsp. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B- cell compartments. *Clin Immunol* 2009; 133: 95-107.
17. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 328-35.
18. Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J i wsp. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T-cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol* 2008; 181: 2271-5.
19. Leguern C. regulatory T cells for tolerance therapy: revisiting the concept. *Crit Rev Immunol* 2011; 31: 189-207.
20. Pender MP. CD8+ T cell deficiency, Epstein-Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis* 2012; 2012:189096.